



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 344 932**

⑫ Número de solicitud: 200900373

⑬ Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **10.02.2009**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **09.09.2010**

Fecha de la concesión: **17.06.2011**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **30.06.2011**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
30.06.2011

⑲ Titular/es: **FUNDACIÓN DE LA COMUNIDAD
VALENCIANA CENTRO DE INVESTIGACIÓN
PRÍNCIPE FELIPE
Avda. Autopista del Saler, 16 - 3
(Junto Oceanográfico)
46012 Valencia, ES**

⑳ Inventor/es: **Sánchez del Pino, Manuel**

㉑ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

㉒ Título: **Método para la detección de cáncer de vejiga.**

㉓ Resumen:

Método para la detección de cáncer de vejiga.

La presente invención se refiere a un método y kit para la detección de cáncer de vejiga mediante la determinación del nivel de expresión de la cadena beta de la proteína del complemento C4A.

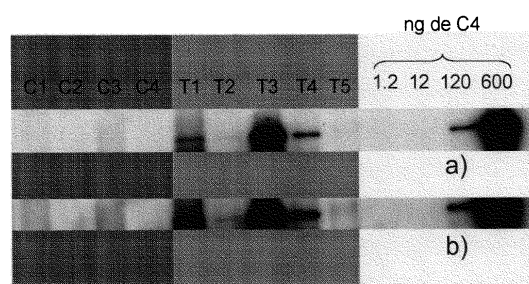


FIG. 3

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

ES 2 344 932 B1

DESCRIPCIÓN

Método para la detección de cáncer de vejiga.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra en general en el campo de la biomedicina y en particular se refiere a un método y kit para la detección del cáncer de vejiga.

10 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de vejiga es uno de los tipos de cáncer más frecuentes, siendo el cuarto cáncer más frecuente en hombres y el octavo en mujeres, representado aproximadamente el 5% del total de los cánceres diagnosticados en Estados Unidos (A. Jemal, T. Murray, A. Samuels, A. Ghafoor, E. Ward, M.J. Thun, CA Cáncer J Clin 53 (2003) 5). De éstos, más del 90% son carcinomas transicionales (TCC) (E.M. Messing, T.B. Young, V.B. Hunt, K.W. Gilchrist, M.A. Newton, L.L. Bram, W.J. Hisgen, E.B. Greenberg, M.E. Kuglitsch, J.D. Wegenke, Urology 45 (1995) 387), (J.P. Stein, G.D. Grossfeld, D.A. Ginsberg, D. Esrig, J.A. Freeman, A.J. Figueroa, D.G. Skinner, R.J. Cote, J Urol 160 (1998) 645). Alrededor del 75% de los casos diagnosticados son superficiales y pueden ser extirpados sin demasiadas complicaciones mientras que el 25% restante son de carácter invasivo (V.B. Lokeshwar, M.G. Selzer, Urol Oncol 24 (2006) 528). En estos casos la detección precoz condicionaría el tratamiento y mejoraría las expectativas de los pacientes. Además, el índice de recurrencia del cáncer de vejiga es de los más elevados por lo que los pacientes suelen ser sometidos a controles periódicos tras la primera aparición. La detección precoz de los tumores invasivos así como de los recurrentes, que frecuentemente revisten mayor gravedad que los primariamente detectados, sería de una enorme utilidad para aumentar las expectativas de los pacientes.

En la actualidad, el diagnóstico más seguro se realiza mediante cistoscopia y biopsia. Ambos métodos son invasivos, complicados y costosos. Es por ello que el coste por paciente de cáncer de vejiga desde su detección hasta su muerte sea el más alto de todos los tipos de cáncer (G.F. Riley, A.L. Potosky, J.D. Lubitz, L.G. Kessler, Med.Care 33 (1995) 828), (H. Hedelin, S. Holmang, L. Wiman, Scand J Urol Nephrol 36 (2002) 344), (M.F. Botteman, C.L. Pashos, A. Redaelli, B. Laskin, R. Hauser, Pharmacoeconomics 21 (2003) 1315). El diagnóstico no invasivo más utilizado es la citología de orina. Aunque tiene una alta especificidad presenta una baja sensibilidad y alta variabilidad dependiendo del patólogo que realice el examen (M. Burchardt, T. Burchardt, A. Shabsigh, A. De La Taille, M.C. Benson, I. Sawczuk, Clin Chem 46 (2000) 595). Recientemente se han descrito nuevos marcadores, algunos de ellos aprobados por la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos, que han mostrado una alta sensibilidad (V.B. Lokeshwar, M.G. Selzer, Urol Oncol 24 (2006) 528), (M. Burchardt, T. Burchardt, A. Shabsigh, A. De La Taille, M.C. Benson, I. Sawczuk, Clin Chem 46 (2000) 595), (V.B. Lokeshwar, T. Habuchi, H.B. Grossman, W.M. Murphy, S.H. Hautmann, G.P. Hemstreet, 3rd, A.V. Bono, R.H. Getzenberg, P. Goebell, B.J. Schmitz-Drager, J.A. Schalken, Y. Fradet, M. Marberger, E. Messing, M.J. Droller, Urology 66 (2005) 35), (H.B. Grossman, M. Soloway, E. Messing, G. Katz, B. Stein, V. Kassabian, Y. Shen, Jama 295 (2006) 299), (B.W. van Rhijn, H.G. van der Poel, T.H. van der Kwast, Eur Urol 47 (2005) 736). No obstante, la relativamente baja especificidad y reproducibilidad hacen que la cistoscopia y la citología sean todavía las técnicas más utilizadas (V.B. Lokeshwar, M.G. Selzer, Urol Oncol 24 (2006) 528), (M. Burchardt, T. Burchardt, A. Shabsigh, A. De La Taille, M.C. Benson, i. Sawczuk, Clin Chem 46 (2000) 595), (V.B. Lokeshwar, T. Habuchi, H.B. Grossman, W.M. Murphy, S.H. Hautmann, G.P. Hemstreet, 3rd, A.V. Bono, R.H. Getzenberg, P. Goebell, B.J. Schmitz-Drager, J.A. Schalken, Y. Fradet, M. Marberger, E. Messing, M.J. Droller, Urology 66 (2005) 35), (H.B. Grossman, M. Soloway, E. Messing, G. Katz, B. Stein, V. Kassabian, Y. Shen, Jama 295 (2006) 299), (B.W. van Rhijn, H.G. van der Poel, T.H. van der Kwast, Eur Urol 47 (2005) 736), (H. Boman, H. Hedelin, S. Holmang, J Urol 167 (2002) 80). El funcionamiento y utilidad de estos marcadores también difiere según se trate de una detección primaria o durante el seguimiento de los pacientes ya diagnosticados. Hasta el momento, los resultados obtenidos no justifican su utilización de forma generalizada ya que, si bien suelen ser más sensibles que la citología urinaria, su grado de especificidad está por debajo.

La búsqueda de nuevos biomarcadores de cáncer de vejiga sigue teniendo, por tanto, un gran interés médico y de salud pública.

55 **Descripción de la invención**

La presente invención proporciona un método de diagnóstico de cáncer de vejiga de forma sencilla y fiable, de tal forma que puede ser incluido en la práctica clínica habitual.

Así pues en primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la detección de cáncer de vejiga que comprende

- a) analizar una muestra obtenida de un paciente,
- b) determinar el nivel de expresión de la cadena beta de la proteína de complemento C4A,
- c) comparar dicho nivel de expresión con un valor control,

donde la alteración del nivel de expresión de dicha proteína es indicativo de cáncer de vejiga.

En un aspecto más en particular, el término “alteración del nivel de expresión” tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la expresión anormalmente alta de la cadena beta de la proteína de complemento C4A comparado con un valor control. En un aspecto más en particular, la proteína expresa de 3 a 15 veces más en las muestras tumorales que las muestras control. En un aspecto más en particular, la proteína se expresa 10 veces más en las muestras tumorales que en las muestras control.

Por valor control en la presente invención, nos referimos a un valor obtenido de muestras sin cáncer de vejiga y sin ninguna otra enfermedad.

En un aspecto más en particular, en el método de la presente invención, el nivel de expresión de la cadena beta de la proteína de complemento C4A se determina mediante técnicas de inmunoquímica. A título ilustrativo y sin que se limite el alcance de la invención, el término “técnicas inmunoquímicas” tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a: ELISA, Western blot, biochips o microarrays de proteínas, o cualquier otra técnica que incluya anticuerpos específicos frente a la cadena beta de la proteína de complemento C4A.

En un aspecto más en particular de la presente invención, el nivel de la cadena beta de la proteína de complemento C4A se determina mediante anticuerpos policlonales. En otro aspecto más en particular, el método de la presente invención se realiza mediante anticuerpos monoclonales.

El término “muestra” tal y como se utiliza en la presente invención se refiere pero no se limita, a tejidos y/o fluidos (sangre, orina). En un aspecto más en particular de la presente invención, la muestra obtenida del paciente es un fluido, más en particular, es orina, y más en particular es la fracción celular de la orina. En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la detección de cáncer de vejiga que comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo el método descrito en la presente invención.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra el gel de electroforesis bidimensional.

La figura 2 se refiere a la cuantificación de la cadena beta de la proteína de complemento C4A mediante el análisis DIGE para cada una de las bandas (spots) de la proteína: 2A: Average ratio (tumor/control). 14.35, t-test: 0.0122; presente en 8 de 9 geles, 2B: Average ratio (tumor/control). 13.39, t-test: 0.0134; presente en 9 de 9 geles, 2C: Average ratio (tumor/control). 17.72, t-test: 0.0095; presente en 8 de 9 geles, 2D: Average ratio (tumor/control). 10.51, t-test: 0.0122; presente en 9 de 9 geles.

La figura 3 muestra el resultado del Western blot. C1, C2, C3 y C4 se refieren a las muestras control, T1, T2, T3, T4 y T5 se refieren a las muestras obtenidas de los pacientes con tumor de vejiga, a) muestra los resultados después de un minuto de exposición y b) muestra los resultados tras tres minutos de exposición.

Descripción detallada de la invención

Mediante técnicas de proteómica, en concreto mediante la metodología DIGE detectamos que la cadena beta de la proteína de complemento C4A tenía una expresión diferencial en pacientes con cáncer de vejiga y en pacientes control o sanos.

Las muestras se obtuvieron en el Servicio de Urología del Hospital Lluís Alcanyís de Xàtiva (Valencia) tras la correspondiente aprobación de su Comité Ético y el consentimiento informado de los pacientes.

Se utilizaron muestras de orina de 10 sujetos control, 10 pacientes diagnosticados con carcinoma transicional de vejiga que todavía no habían recibido tratamiento y 10 pacientes con tumores recurrentes.

Las muestras de orina recién colectadas se fijaron añadiendo etanol al 15% (v/v final) y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento. Posteriormente, el componente celular se concentró mediante centrifugación a 1000 g x 45 min a 4°C. El sobrenadante se congeló a -20°C hasta su utilización. El sedimento se resuspendió en 1 ml de tampón PBS (Na_2HPO_4 4,3 mM, KH_2PO_4 1,4 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,2.) y se pasó a un tubo de microcentrífuga de 2 ml. A continuación se creó un colchón de sacarosa depositando 100 μl de sacarosa 250 mM en el fondo del tubo y se centrifugó a 13400 g x 50 min 4°C. En estas condiciones, sólo el componente celular atravesó la solución de sacarosa. Las células se lavaron nuevamente en PBS. El sedimento se congeló a -20°C hasta su utilización.

Las células purificadas se lisaron en tampón de lisis (urea 7M, tiourea 2 M, CHAPS 4% y Tris 20 mM) mediante homogeneización mecánica en un tubo microcentrífuga de 1,5 ml seguido de varios pulsos breves de sonicación para romper el DNA. A continuación se precipitaron las proteínas para la eliminación de sales y otras sustancias que interfieren con el mareaje y la electroforesis usando el kit 2-D Clean-Up de GE Healthcare siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas se resuspendieron en tampón de lisis y se determinó la concentración mediante el método de Bradford (BioRad Protein Assay), usando inmunoglobulina gamma como estándar. El mareaje de las muestras con los fluoróforos CyDye DIGE Fluor de GE Healthcare se realizó siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. La mitad de las muestras de cada grupo se marcaron con Cy3 y la otra mitad con Cy5. El estándar interno

ES 2 344 932 B1

se preparó mediante mezcla a partes iguales de todas las muestras y se marcó con Cy2. El mareaje se realizó incubando en hielo y en oscuridad 50 μ g de proteína y 400 pmoles de fluoróforo durante 30 minutos. La reacción de mareaje se terminó incubando las muestras con lisina durante 10 minutos. Posteriormente se mezclaron para cada gel 50 μ g de proteína marcada con cada uno de los fluoróforos según la siguiente tabla (C: control; T: tumor primario; R: tumor recurrente; S: estándar interno):

	Gel	Cy3	Cy5	Cy2
10	gel 1	C1	T6	S
	gel 2	C2	T7	S
	gel 3	C3	T8	S
15	gel 4	T1	C9	S
	gel 5	T2	C10	S
20				
	gel 6	C4	R9	S
	gel 7	C5	R10	S
25	gel 8	R1	C6	S
	gel 9	R2	C7	S
30	gel 10	R3	C8	S
	gel 11	R4	T9	S
35	gel 12	R5	T10	S
	gel 13	T3	R6	S
40	gel 14	T4	R7	S
	gel 15	T5	R8	S

A continuación se realizó una electroforesis bidimensional. En la 1ª dimensión, isoelectroenfoque (IEF), las proteínas se separaron por punto isoelectroenfoque en tiras Immobiline DryStrips de 24 cm, rango de pH 3-10 (NL). Para ello primero se hidrataron las tiras durante 20 horas en urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, DeStreak (12 μ l/ml) y 1% de tampón IPG (rango de pH 3-10). La muestra se cargó en la tira por el procedimiento de *cup loading* anódico. La separación se realizó según el siguiente protocolo: Step 300V 3h, Gradiente 1000V 6h, Gradiente 8000V 3h, Step 8000V 32000 Vh a 20°C.

En la 2ª dimensión, SDS-PAGE, la separación se realizó en función del peso molecular. Para ello se utilizaron geles de 25 cm x 21 cm del 12.5% acrilamida. La electroforesis se desarrolló a 2 w/gel durante 1 hora y a 15 w/gel durante 5 horas. Tras la electroforesis los geles se escanearon para cada uno de los tres fluoróforos de manera independiente utilizando un Typhoon™ 9400 Variable Mode Imager. Figura 1.

Posteriormente se llevó a cabo el Análisis DIGE. El análisis de las imágenes de los geles se realizó con el programa DeCyder™ *Differential Analysis Software*. Este análisis incluyó la co-detección y cuantificación de los spots de proteína marcados con cada uno de los fluoróforos. Dentro de cada gel se calculó la abundancia relativa (respecto al estándar interno) de cada una de las muestras a comparar.

Como resultado comprobamos que había varios spots que de manera estadísticamente significativa estaban aumentados con respecto al control.

El siguiente paso fue la identificación de proteína correspondiente. Para ello se recortaron los spots correspondientes de los geles y las proteínas se digirieron con tripsina mediante protocolos establecidos (A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 850). Una alícuota de los péptidos obtenidos se analizó inicialmente utilizando un MALDI TOF/TOF 4700 (Applied Biosystems). Con los espectros de masas obtenidos

ES 2 344 932 B1

se realizó una búsqueda en la base de datos UniProt (<http://www.expasy.org/sprot/>) utilizando el motor de búsqueda Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) instalado en nuestros servidores para identificar la proteína correspondiente mediante huella peptídica. Los resultados se muestran en la figura 1.

5 Ejemplos

Los presentes ejemplos pretenden ser ilustrativos de la invención y nunca limitativos

Ejemplo 1

10

Gel de electroforesis y Western blotting

Con la fracción celular de las muestras de orina se realizó una electroforesis de SDS/PAGE con 30 μ g de proteína. Como control positivo se utilizaron distintas cantidades de proteína “Complement C4” de Sigma (C8195). Después se transfirieron a una membrana y se revelaron con anticuerpo C4beta (H-300): sc-25816 (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1/200.

15

Los resultados mostraron que los niveles de la cadena beta de la proteína de complemento C4A están sobreexpresados en las muestras correspondientes a los pacientes con cáncer de vejiga (figura 3).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para la detección de cáncer de vejiga que comprende

- d) analizar una muestra obtenida de un paciente,
- e) determinar el nivel de expresión de la cadena beta de la proteína de complemento C4A,
- f) comparar dicho nivel de expresión con un valor control,

donde la alteración del nivel de expresión dicha proteína es indicativo de cáncer de vejiga.

2. Método para la detección de cáncer de vejiga según la reivindicación 1, donde el nivel de expresión de la cadena beta de la proteína de complemento C4A se realiza mediante técnicas de inmunoquímica.

3. Método para la detección de cáncer de vejiga según la reivindicación 2, donde las técnicas de inmunoquímica se lleva a cabo mediante la utilización de anticuerpos.

4. Método para la detección de cáncer de vejiga según la reivindicación 3, donde los anticuerpos son anticuerpos policlonales.

5. Método para la detección de cáncer de vejiga según la reivindicación 3, donde los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

6. Método para la detección de cáncer de vejiga según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra a analizar es un fluido.

7. Método para la detección de cáncer de vejiga según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra a analizar es el componente celular de la orina.

8. Kit para la detección de cáncer de vejiga que comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

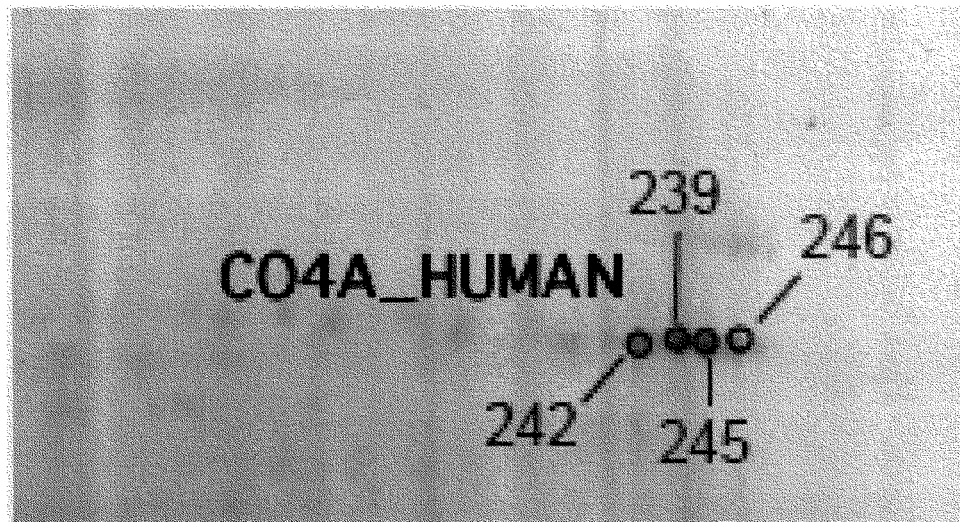


FIG. 1

log ratio

239

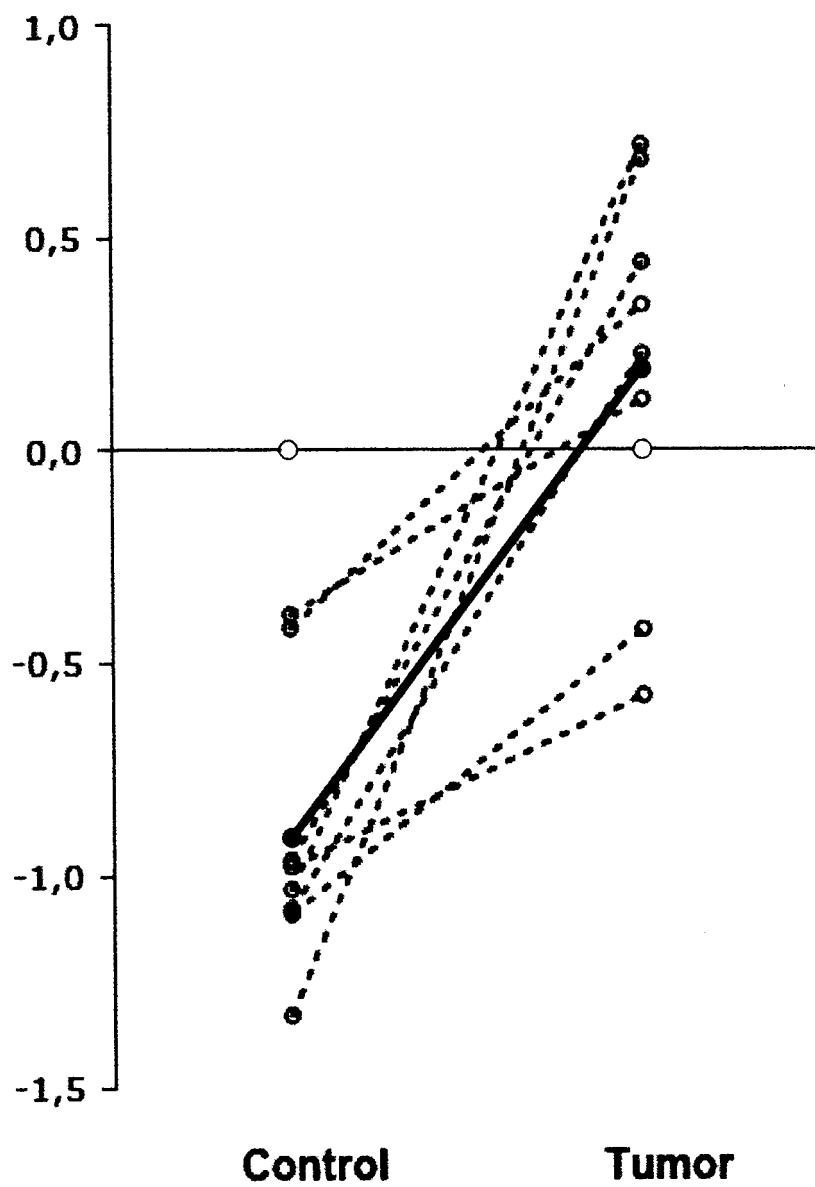


FIG. 2A

log ratio

242

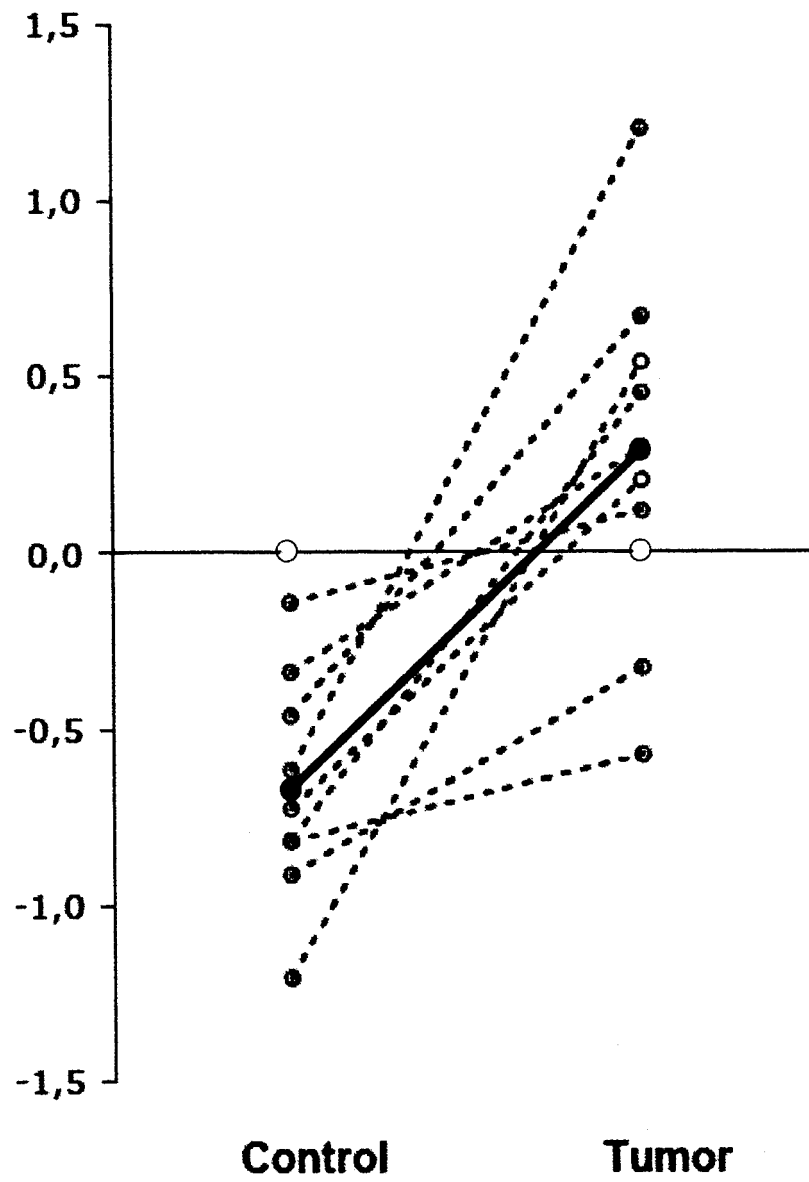


FIG. 2B

log ratio

245

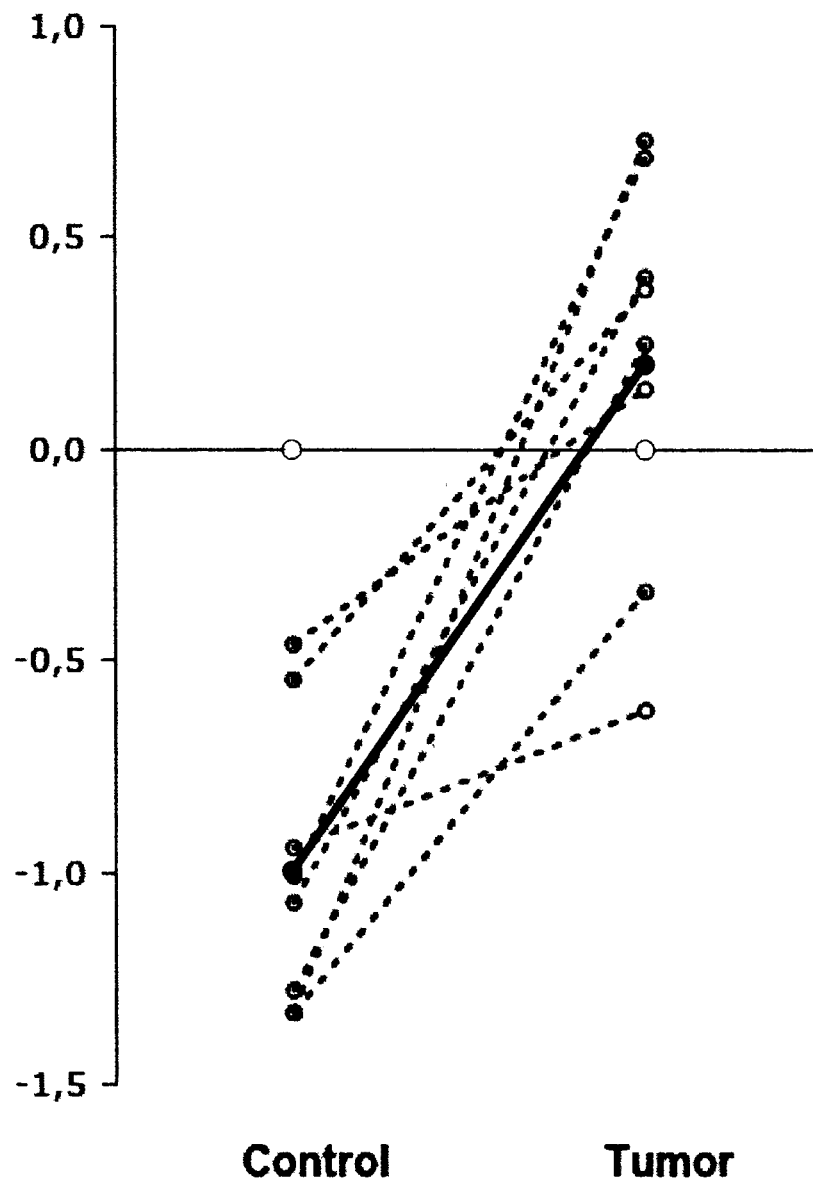


FIG. 2C

log ratio

246

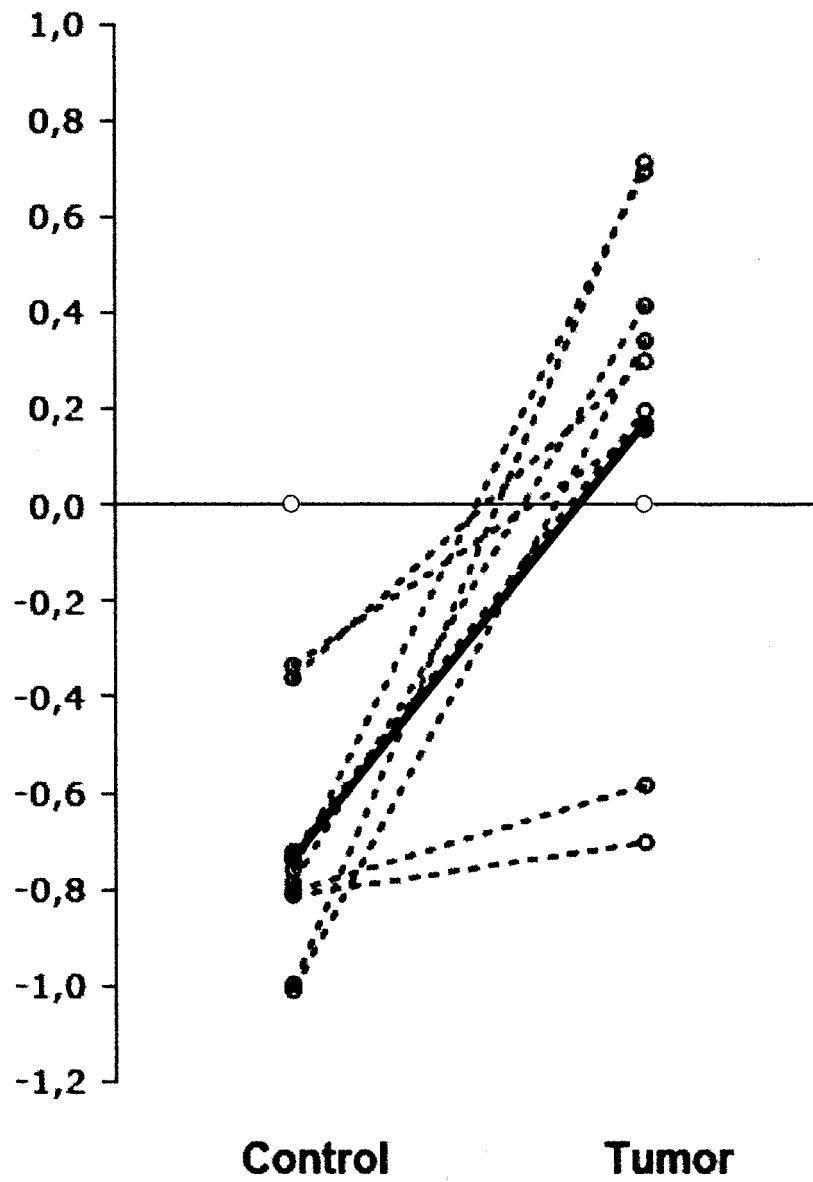


FIG. 2D

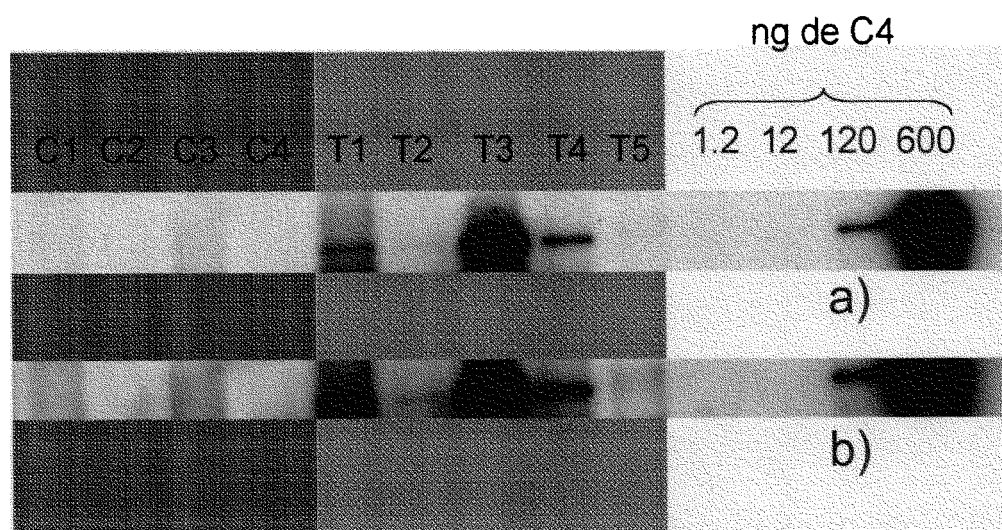


FIG. 3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 344 932

⑫ Nº de solicitud: 200900373

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 10.02.2009

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **G01N 33/574** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2007134132 A2 (GENENTECH, INC.) 22.11.2007, reivindicaciones.	1-8
A	WO 2006012522 A1 (PACIFIC EDGE BIOTECHNOLOGY LTD.) 02.02.2006, resumen; figuras 2-5.	1-8
A	LOKESHWAR, V.B. et al. "Urinary bladder tumor markers". UROLOGI ONCOLOGY. Noviembre-Diciembre 2006. Vol. 24, Nº. 6, páginas 528-537; todo el documento.	1-8
A	WO 2007035766 A2 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 29.03.2007, reivindicaciones.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.08.2010

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, HCAPLUS, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.08.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-8	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-8	SÍ
	Reivindicaciones		NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

Consideraciones:

La invención consiste en un método de diagnóstico del cáncer de vejiga, que consiste en la determinación de los niveles de la cadena beta del componente del complemento C4A en muestras de orina. Los niveles de dicha cadena beta, se encuentran elevados en la orina de pacientes con cáncer de vejiga. La invención también incluye el kit para llevar a cabo la determinación.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007134132 A2	22-11-2007
D02	WO 2006012522 A1	02-02-2006
D03	LOKESHWAR, V.B. et al. "Urinary bladder tumor markers". URO-LOGIC ONCOLOGY. Noviembre-Diciembre 2006. Vol. 24, N°. 6, páginas 528-537; todo el documento.	- -
D04	WO 2007035766 A2	29-03-2007

Observaciones sobre documentos:

El documento D01, describe una proteína GOUTC-1, que se expresa en enfermos de cáncer de vejiga y se utiliza como marcador para diagnosticar dicha enfermedad.

El documento D02, describe numerosos marcadores útiles en el diagnóstico de cáncer de vejiga en muestras de orina. Dichos marcadores se identifican por PCT cuantitativa y análisis en micromatriz ("microarray"). El documento D03, describe la identificación de marcadores para el diagnóstico del cáncer de vejiga, por medio de electroforesis 2D.

El documento D04, describe la utilización de la proteína PCI (inhibidor de la proteína C) en el diagnóstico del cáncer de próstata. La proteína se utiliza sola o combinada con el componente del complemento C4A (ver página 4).

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

Los documentos D01-D03, describen biomarcadores útiles en el diagnóstico del cáncer de vejiga. No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que describa la cadena beta de C4A como marcador de dicho cáncer.

El documento D04, describe la utilización de C4A como marcador del cáncer de próstata combinado con el marcador PCI.

Los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica y no se consideran de particular relevancia, ya que para una persona experta en la materia no sería obvio aplicar las características de los documentos citados y llegar a la invención tal como se contempla en las reivindicaciones. Por tanto, el objeto de la presente solicitud, cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo a los Art. 6 y 8 de la LP.